

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

(11) Publication number:

(11) Numéro de publication:

0 4 2 5 5 8 7

Internationale Anmeldung veröffentlicht durch die
Weltorganisation für geistiges Eigentum unter der Nummer:

WO 90/13663 (art.158 des EPÜ).

International application published by the World
Intellectual Property Organisation under number:

WO 90/13663 (art.158 of the EPC).

Demande internationale publiée par l'Organisation
Mondiale de la Propriété Intellectuelle sous le numéro:

WO 90/13663 (art.158 de la CBE).

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : <p style="text-align: center; margin-top: 10px;">C12Q 1/04, C12M 1/34</p>	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 90/13663 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. November 1990 (15.11.90)
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 55%;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT89/00110</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 24. November 1989 (24.11.89)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: A 1147/89 12. Mai 1989 (12.05.89) AT</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): AVL AG [CH/CH]; Stettenerstraße 28, Ch-8207 Schaffhausen (CH).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : KARPF, Hellfried [AT/AT]; Leechgasse 78, A-8010 Graz (AT). SMOLE, Herbert [CH/CH]; Adlergut 6, CH-8253 Diessenhofen (CH).</p> <p>(74) Anwälte: KRAUSE, Walter usw. ; Singerstraße 8, Postfach 200, A-1014 Wien (AT).</p> </div> <div style="width: 40%; vertical-align: top;"> <p>+(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), JP, US.</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p> </div> </div>		

(54) Title: PROCESS FOR DETERMINING BIOLOGICAL ACTIVITIES IN A SAMPLE AND A DEVICE FOR IMPLEMENTING IT

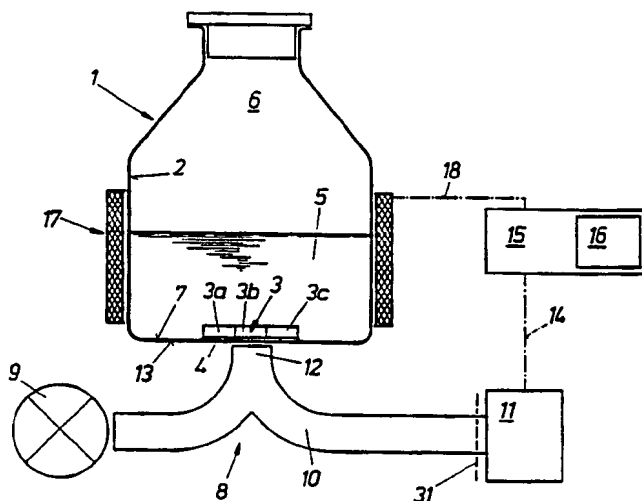
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR FESTSTELLUNG BIOLOGISCHER AKTIVITÄTEN IN EINER PROBE UND VORRICHTUNG ZUR DURCHFÜHRUNG DES VERFAHRENS

(57) Abstract

A process and device for determining biological activities in a sample, for instance a blood sample, is proposed in which there is a sealable vessel which contains a nutritive solution and serves to hold the sample, with devices which, in the presence of micro-organisms in the sample, facilitate metabolic processes during which the concentration of the substances transformable by the metabolism alters. In order to detect the changes in concentration there are optodes (3a, 3b, 3c) in contact with the sample and an exciting and detection device (8) allocated to the optodes to which is connected an assessment device (15) to determine the change in the concentration of the substances over time.

(57) Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Feststellung biologischer Aktivitäten in einer Probe, beispielsweise in einer Blutprobe, vorgeschlagen, wobei ein verschließbarer Behälter vorgesehen ist, welcher eine Nährlösung enthält und zur Aufnahme der Probe dient, wobei Einrichtungen vorgesehen sind, die bei vorliegen von Mikroorganismen in der Probe metabolische Prozesse ermöglichen, wobei sich die Konzentration der durch den Metabolismus umsetzbaren Stoffe ändert. Zur Erfassung der Konzentrationsänderungen sind direkt mit der Probe in Kontakt stehende Optoden (3a, 3b, 3c) sowie eine den Optoden zugeordnete Anregungs- und Detektionseinrichtung (8) vorgesehen, mit welcher eine Auswerteeinrichtung (15) zur Feststellung der zeitlichen Änderung der Konzentration der Stoffe verbunden ist.



BENENNUNGEN VON "DE"

Bis auf weiteres hat jede Benennung von "DE" in einer internationalen Anmeldung, deren internationaler Anmeldetag vor dem 3. Oktober 1990 liegt, Wirkung im Gebiet der Bundesrepublik Deutschland mit Ausnahme des Gebietes der früheren DDR.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	MG	Madagaskar
AU	Australien	FI	Finnland	ML	Mali
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BJ	Benin	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BR	Brasilien	IT	Italien	SD	Sudan
CA	Kanada	JP	Japan	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SU	Sowjet Union
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
DE	Deutschland, Bundesrepublik	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	MC	Monaco		

Verfahren zur Feststellung biologischer Aktivitäten in einer Probe und Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens

Erfindung betrifft ein Verfahren zur Feststellung biologischer Aktivitäten in einer Probe, wobei die Probe und eine Nährlösung in einen verschließbaren Behälter gefüllt und Bedingungen ausgesetzt werden, welche bei Vorliegen von Mikroorganismen in der Probe metabolische Prozesse ermöglichen, wobei die Konzentration von Ausgangsstoffen vermindert und jene von Stoffwechselprodukten erhöht wird und eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

Für viele Anwendungsgebiete ist es wichtig, rasch feststellen zu können, ob eine Probe mit Mikroorganismen, beispielsweise mit Bakterien, kontaminiert ist, wobei hier vor allem der medizinische Bereich, die pharmazeutische Industrie, die Lebensmittelindustrie sowie der Umweltschutz zu nennen wäre. Der Begriff "Probe" soll hier sehr umfassend gedeutet werden und vor allem folgende Substanzen beinhalten: Festes und flüssiges biologisches Material (z.B. Blut), Lebensmittelproben, wie Tiefkühlkost und Konserven, Verpackungsmaterial, klinische Instrumente und Laborgeräte bzw. von deren Oberflächen entnommene Proben, medizinisches Gerät, Hilfs- und Verbandstoffe sowie Erdproben und Wasserproben, insbesondere Trinkwasserproben.

Seit langem sind rein manuelle Methoden bekannt, bei welchen die zu untersuchende Probe einem Kulturgefäß mit einer Nährlösung zugesetzt wird, wobei dann in bestimmten Abständen rein visuell das Wachstum der Kultur beobachtet wird, um daraus auf die Art oder das Vorhandensein eines Mikroorganismus zu schließen.

Es sind auch bereits einige technische Verfahren bzw. Vorrichtungen bekannt, mit welchen die von Mikroorganismen verursach-

ten biologischen Aktivitäten in einer Probe festgestellt werden können, wobei z.B. das durch den Metabolismus der Mikroorganismen entstehende CO_2 , bzw. die Änderung des CO_2 -Gehaltes als Meßwert für die Bestimmung der biologischen Aktivität herangezogen wird.

So ist es beispielsweise bekannt, die zu untersuchende Probe zusammen mit einer radioaktiv markierten Nährlösung in einen Behälter einzuschließen und die sich über der Nährlösung befindliche Atmosphäre auf das Vorhandensein radioaktiver Gase zu untersuchen, woraus auf Mikroorganismen in der Probe geschlossen werden kann.

Meßsysteme dieser Art sind beispielsweise aus der US-PS 3 676 679 oder 3 935 073 bekannt. Obwohl solche Meßsysteme rasch und zuverlässig arbeiten, haben sie den Nachteil, daß radioaktive Substanzen gehandhabt werden müssen und es notwendig ist, kontinuierlich Proben aus dem Gasraum über der Nährlösung zu entnehmen und zu vermessen. Bei der Entnahme der Proben aus dem Gasraum kann es durch das Entnahmeorgan leicht zu Kontaminationen der übrigen zu vermessenden Proben kommen, wodurch es leicht zu Falschaussagen kommen kann.

Aus der EP-A 0 158 497 ist es weiters bekannt, die biologische Aktivität einer Probe mit Hilfe der Infrarot-Absorption zu bestimmen. Dabei wird einem geschlossenen Behälter, welcher eine Nährlösung enthält, eine Probe zugesetzt, welche auf das Vorliegen von Mikroorganismen untersucht wird. Der Behälter wird dann bestimmten Bedingungen ausgesetzt, insbesondere werden bestimmte Temperaturen über festgelegte Zeiträume eingehalten, welche den Metabolismus der Mikroorganismen ermöglichen, wobei im Gasraum über der Nährlösung unter Umwandlung der Kohlenstoffquelle CO_2 gebildet wird. Aus dem Gasraum wird dann eine Probe entnommen und einer Meßzelle zugeführt, wo mittels Infrarot-Absorption der CO_2 -Gehalt gemessen wird. Auch hier besteht das Problem der Kontamination nachfolgender Proben, wobei als weiterer Nachteil anzuführen ist, daß die Infrarot-Absorptionsmessung weniger sensitiv ist als die Meßmethode mit radioaktiver Markierung.

Um das Problem der Kreuzkontamination zu vermeiden, wird in der EP-A 0 104 463 ein Verfahren sowie eine Vorrichtung der

eingangs genannten Art vorgeschlagen, welche ebenfalls auf der Basis der Infrarot-Absorptionsmessung des durch metabolische Prozesse entstehenden CO_2 beruht. Dabei erfolgt jedoch keine Probennahme, sondern Infrarotstrahlung wird direkt durch die Behälterwand in den Gasraum über der Nährlösung geleitet und deren Absorption gemessen. Durch diese nichtinvasive Meßmethode können zwar Kreuzkontaminationen weitgehend ausgeschlossen werden; nachteilig bei dieser Methode ist jedoch die nach wie vor geringere Sensitivität gegenüber radiometrischen Verfahren, sowie die Tatsache, daß das Meßergebnis durch andere Gaskomponenten, welche im gleichen Frequenzband wie CO_2 absorbieren, verfälscht wird. Als Beispiel wären hier vor allem die Absorptionsbanden von Wasserstoffdampf zu nennen. Die verwendeten Probenbehälter müssen in einem relativ engen Frequenzbereich durchlässig sein, sodaß nur bestimmte Behältermaterialien in Frage kommen. Ein zusätzlicher Nachteil besteht darin, daß die Erzeugung bzw. Filterung der benötigten Infrarotstrahlung relativ aufwendig und teuer ist.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren bzw. eine Vorrichtung zur Feststellung biologischer Aktivitäten in einer Probe vorzuschlagen, welches zumindest dieselbe Sensitivität wie radiometrische Verfahren aufweist, wobei es wünschenswert ist, nähere Angaben über die Art der Mikroorganismen zu gewinnen und Kreuzkontaminationen zu vermeiden sowie ein billiges, einfaches Meßverfahren zu realisieren.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß die Konzentration zumindest eines durch metabolische Prozesse umsetzbaren (gewonnenen oder verbrauchten) Stoffes kontinuierlich gemessen wird und bei Änderung der Konzentration um einen vorgebbaren Schwellwert die Konzentrationsänderung zumindest eines weiteren Stoffes gemessen wird, wobei mittels Optoden, welche in direktem Kontakt mit den zu messenden Stoffen stehen ein Meßsignal erzeugt wird, aus dessen zeitlicher Änderung auf das Vorliegen von Mikroorganismen geschlossen wird. Die in Massenfertigung billig herstellbaren optischen Sensoren (Optoden), welche mit der zu messenden Substanz in direktem Kontakt stehen, ermöglichen kontinuierliche Messungen in abgeschlossenen Systemen, wobei für jede Probe neue Optoden verwendet werden und so Kreuzkontaminationen ausgeschlossen werden. Beispielsweise kann im Minimalfall bereits ein Zwei-

fach-Sensor (Bisensor) ausreichen, um anhand der relativen Änderungen der Konzentrationen der erfaßten Stoffe gegenüber den Ausgangskonzentrationen eine Aussage über die Art der Mikroorganismen zu treffen.

Erfindungsgemäß ist vorgesehen, daß die Konzentration zumindest zweier Stoffe aus der Gruppe CO_2 , O_2 , $\text{H}^+(\text{pH})$, NH_4^+ , H_2S und H_2 gemessen wird, wobei die Indikatorsubstanz der Optoden auf eine Änderung der Konzentration der Stoffe mit einer Änderung ihres Lumineszenz-, Absorptions- oder Reflexionsverhaltens reagiert, bzw. daß die Konzentration zumindest zweier Stoffe aus der Gruppe CO_2 , O_2 , $\text{H}^+(\text{pH})$ und NH_4^+ gemessen wird, wobei die Indikatorsubstanz der Optoden auf eine Änderung der Konzentration der Stoffe mit einer Änderung der Lumineszenzabklingzeit der emittierten Lumineszenzstrahlung reagiert. Es können somit alle, in metabolischen Prozessen eine wesentliche Rolle spielenden Stoffe durch zumindest ein optisches Meßprinzip erfaßt werden.

Insbesondere ist entsprechend der Erfindung bei der Messung von z.B. Blutproben vorgesehen, daß die CO_2 -Konzentration kontinuierlich gemessen und daß nach deren Anstieg um 0,1 bis 10% über einen minimalen Wert die Änderung der O_2 -Konzentration und die Änderung des pH-Wertes bestimmt wird.

Es ist entsprechend der Erfindung auch möglich, die O_2 -Konzentration kontinuierlich zu messen und nach deren Abfall um 0,1 bis 10% von einem maximalen Wert die Änderung der CO_2 -Konzentration und die Änderung des pH-Wertes zu bestimmen. Das hat den Vorteil, daß bei der O_2 -Konzentration bereits zu früheren Zeitpunkten signifikante Änderungen meßbar sind.

Entsprechend der untenstehenden Tabelle kann dabei nach einer Änderung der CO_2 -Konzentration um 0,1 bis 10% äußerst rasch eine Entscheidungshilfe bei der Beurteilung der in Frage kommenden Bakterienstämme angeboten werden, wobei zumindest eine Einschränkung auf wenige Spezies möglich ist.

Gruppe	O ₂ -Änderung	pH-Änderung	Gram
Enterobacteriaceae	↓	↓	neg.
Pseudomonas Spezies	↓↓	+/-o	neg.
Acinetobacter Spezies	↓↓	↓	neg.
Bakteroide Spezies	+/-o	↓	neg.
Staphylokokkus	↓↓	↓↓	pos.
Staphylokokkus epidermidis	↓	↓	pos.
Streptokokkus faecalis	↓↓	↓↓	pos.
Streptokokkus pyogenes	↓	↓↓	pos.
Streptokokkus pneumoniae	↓	↓↓	pos.
Candida albicans	↓	↓↓	pos.
Chlostridium perfringens	+/-o	↓↓	pos.

Für die Änderung der O₂-Konzentration bedeutet schwach fallend (↓) eine Änderung im Bereich von 3 bis 21% des Ausgangs- bzw. Maximalwertes und stark fallend (↓↓) eine Änderung über 21%. Bei der pH-Änderung liegt die Grenze zwischen schwach fallendem (↓) und stark fallendem (↓↓) pH-Wert bei 0,15% des Ausgangswertes.

Beispielsweise kann bei schwach fallender O₂ -Konzentration und schwach fallendem pH-Wert (zu sauren Werten) auf das Vorliegen von Enterobakterien oder auf das Vorhandensein von Staphylokokkus epidermidis geschlossen werden.

Erfindungsgemäß kann zusätzlich die Gramfärbung der Probe auf bekannte Art festgestellt werden, wobei bei negativer Gramfärbung auf Enterobakterien und bei positiver Gramfärbung auf Staphylokokkus epidermidis geschlossen wird.

Weiters lassen sich durch die in der Tabelle vermerkten Änderungen der O₂-Konzentration und des pH-Wertes die angeführten Spezies unterscheiden.

Für einfache Anwendungsfälle bzw. wenn die Art des Mikroorganismus bekannt ist oder durch andere Verfahren bestimmt wird, ist erfindungsgemäß vorgesehen, daß die CO₂-Konzentration mittels eines im Behälter angeordneten, von außen mit Anregungsstrahlung versorgten CO₂-sensitiven Fluoreszenz-Sensor gemessen wird, sowie daß aus der zeitlichen Änderung des vom Fluoreszenz-Sensor emittierten Signals auf das Vorliegen von Mikroorganismen geschlossen wird.

Weiters ist im Rahmen dieser Erfindung vorgesehen, daß in einen verschließbaren Behälter eine Kohlenstoff-Verbindung enthaltende Nährlösung gefüllt wird, daß der Nährlösung ein auf die Änderung des CO_2 -Gehaltes mit einer Änderung des Fluoreszenzverhaltens reagierender Fluoreszenzindikator zugesetzt wird, daß in den Behälter eine Blutprobe eingebracht wird, wobei bei Vorliegen von Mikroorganismen in der Probe metabolische Prozesse ermöglicht werden, bei welchen CO_2 produziert wird, daß der Inhalt des Behälters mit Anregungsstrahlung beaufschlagt und die vom Fluoreszenzindikator emittierte Strahlung gemessen wird, wobei aus einer Änderung des Fluoreszenzverhaltens auf das Vorliegen von Mikroorganismen geschlossen wird. Zum Beispiel können aus der DE-A 23 60 384 bekannte Indikatorkapseln bzw. indikatorhaltige Mikrokapseln, deren Kapselwände beispielsweise aus polymerisierten hydrophilen Monomeren bestehen und Durchmesser von 20 - 200 nm aufweisen, zugesetzt werden.

Eine erfindungsgemäße Vorrichtung zur Feststellung biologischer Aktivitäten in einer Probe, wobei ein verschließbarer Behälter vorgesehen ist, welcher eine Nährlösung enthält und zur Aufnahme der Probe dient, wobei Einrichtungen vorgesehen sind, die bei Vorliegen von Mikroorganismen in der Probe metabolische Prozesse ermöglichen, ist dadurch gegeben, daß mehrere Optoden zur gleichzeitigen Bestimmung mehrerer durch den metabolischen Prozeß in deren Konzentration veränderbarer Stoffe vorgesehen sind, sowie daß eine jeder Optode zugeordnete Anregungs- und Detektionseinrichtung vorgesehen ist, mit welcher eine Auswerteeinrichtung zur Feststellung der zeitlichen Änderung der Konzentration der Stoffe verbunden ist. Dabei sind unterschiedliche Kombinationen von jeweils zwei Optoden (z.B. O_2 und pH) zu einem Bisensor oder von jeweils drei Optoden (CO_2 , O_2 und pH) zu einem Trisensor von Vorteil.

Erfindungsgemäß sind Optoden zur selektiven Erfassung zumindest zweier im metabolischen Prozeß als Ausgangs-, Zwischen- oder Endprodukt vorliegender Stoffe aus der Gruppe CO_2 , O_2 , H_2 , $\text{H}^+(\text{pH})$, NH_4^+ und H_2S , vorhanden.

Dabei kann die Anregungs- und Detektionseinrichtung eine Lichtquelle und einen Detektor sowie einen vorzugsweise zwei-

armigen Lichtleiter zur Zufuhr der Anregungsstrahlung zur Optode bzw. den Optoden und zur Abfuhr des optischen Signals zum Detektor aufweisen.

Eine vorteilhafte Ausgestaltung der Erfindung sieht vor, daß die Optoden zu einem Multilayer-Sensor zusammengefaßt sind.

In einer einfachen Ausführungsvariante sind die Optoden an der Innenwand eines optisch durchlässigen Behälters fixiert und über deren direkt an die Außenwand des Behälters heranführbare Anregungs- und Detektionseinrichtung mit der Auswerteeinrichtung verbunden. Die in großen Stückzahlen bereits sehr billig herstellbaren Optoden können bei dieser Ausführungsvariante direkt auf die Innenwand des Probenbehälters aufgeklebt werden, welcher bereits mit Nährlösung gefüllt und versiegelt gelagert werden kann. Nach Zugabe der Probe, beispielsweise einer Blutprobe, wird der Behälter die für das Wachstum der Kultur notwendige Zeit thermostatisiert und ggf. geschüttelt, wonach die Konzentration des durch metabolische Prozesse umsetzbaren Stoffes beispielsweise über einen an die Außenwand des Behälters heranführbaren optischen Lichtleiter gemessen wird.

Erfindungsgemäß können zumindest die Optoden im Gasraum des zumindest teilweise optisch durchlässigen Behälters über der mit der Probe versetzten Nährlösung angeordnet sein und die Änderung der Konzentration zumindest eines gasförmigen Metaboliten messen.

Weiters ist es gemäß einer weiteren Ausführungsvariante auch vorgesehen, daß die Optoden an einem den Behälter verschließenden, optisch durchlässigen Stöpsel angeordnet sind.

Es ist bei dieser Methode jedoch auch möglich, daß die Optoden in einem von der mit der Probe versetzten Nährlösung bedeckten Bereich des Behälters, ggf. am Boden des Behälters, angeordnet sind und die Änderung der Konzentration zumindest eines Stoffes in der Nährlösung messen. Letztere Anordnung zeichnet sich dadurch aus, daß der Metabolit praktisch am Orte seines Entstehens gemessen wird, wodurch die Aussage ob eine Kultur positiv oder negativ ist, viel rascher getroffen werden kann.

Eine besonders vorteilhafte Ausgestaltung der Erfindung sieht vor, daß eine Einrichtung zur Thermostatisierung der Probe vorgesehen ist, in welcher in markierten Positionen mehrere Behälter gleichzeitig angeordnet sind, wobei jedem der Behälter eine Anregungs- und Detektionseinrichtung zugeordnet ist, welche die in jedem Behälter angeordneten Optoden mit Anregungsstrahlung versorgt und das resultierende optische Signal detektiert, sowie daß die Signale der Detektionseinrichtung samt einem Positionserkennungssignal der Auswerteeinrichtung zuführbar sind. Die Thermostatisiereinrichtung kann als thermostatisierbare Trägerplatte beispielsweise schachbrettartig ausgebildet sein, wodurch eine große Anzahl von Kulturbedältern, beispielsweise bis zu 600 Stück, gleichzeitig vermessen werden kann. Vorteilhafterweise ist gegenüber herkömmlichen Geräten dieser Art nach dem Einbringen der Probe in die einzelnen Behälter keinerlei Handhabung mehr notwendig, da Brutvorgang und kontinuierliche Messung in einem Gerät vollkommen automatisch erfolgen. Durch die kontinuierliche Messung ist im Gegensatz zu herkömmlichen Meßverfahren, wo die einzelnen Kulturgefäße händisch ein- bis zweimal am Tag in eine Auswerteeinheit eingesetzt werden, verzögerungsfrei der Zeitpunkt feststellbar, ab wann eine Kultur positiv wird. Ab diesem Zeitpunkt können weitere im Stoffwechsel involvierte Stoffe optisch gemessen und die Art der Mikroorganismen bestimmt werden. Es steht somit ein hochsensitives automatisches Meßverfahren zur Verfügung, mit welchem nichtinvasive, kontinuierliche Messungen möglich sind. Die Auswerteeinheit kann entweder selbst einen Mikrocomputer beinhalten, welcher den Status der einzelnen Behälter anzeigt oder über ein Interface mit einem Computer verbunden sein.

Eine andere Ausführungsvariante der Erfindung sieht vor, daß eine Einrichtung zur Thermostatisierung der Probe vorgesehen ist, welche mehrere Behälter gleichzeitig aufnimmt, sowie daß ein Zuführmechanismus oder Probenwechsler vorgesehen ist, welcher die einzelnen Behälter automatisch einem Meßplatz zuführt, in welchem die in jedem Behälter angeordneten Optoden mit der Anregungs- und Detektionseinrichtung in optischen Kontakt treten. Während die oben beschriebene Ausführungsvariante gänzlich ohne bewegliche Teile auskommt, beinhaltet diese Variante einen Probenwechsler herkömmlicher Art, welcher die

einzelnen Proben automatisch einem Meßplatz zuführt. Der Vorteil dieser Anordnung besteht darin, daß der elektronische bzw. elektrooptische Aufwand der Anordnung geringer gehalten werden kann.

Des weiteren ist es erfindungsgemäß möglich, daß die Optoden an der Spitze einer in den Behälter einführbaren Sonde befestigbar sind, welche Sonde Lichtleiteinrichtungen der Anregungs- und Detektionseinrichtung aufnimmt. Beispielsweise kann die Sonde durch eine mit einem Septum verschlossene Öffnung des Behälters in die mit der Probe versetzte Nährlösung oder in den Gasraum darüber eingebracht werden.

Eine weitere Ausführungsvariante der Erfindung sieht vor, daß der Behälter mit einem Septum verschlossen ist, welches von der Hohnadel eines Probennahmegefäßes (Vacutainer) durchstechbar ist, wobei die Optoden im Probennahmegefäß angeordnet sind und nach dem Einbringen der Probe in den die Nährlösung enthaltenden Behälter über die Hohnadel des Probennahmegefäßes eine Strömungsverbindung vom Gasraum des Behälters zu den Optoden besteht. Das Probennahmegefäß kann beispielsweise als evakuiertes Gefäß ausgeführt sein, an dessen Innenwand eine CO_2 - und eine O_2 -Optode fixiert sind. Die Probe, beispielsweise Blut, wird durch das anliegende Vakuum in den Behälter gesogen. Mit der Nadel wird dann das Septum des Behälters mit der Nährlösung durchstoßen, wobei das Blut in das Kulturgefäß eingebracht wird. Über die Hohnadel gelangen nun CO_2 und O_2 aus dem Gasraum über der Nährlösung zum Sensor, wo sie gemessen werden. Kulturbedälter und Probennahmegefäß sind vorzugsweise als Einwegartikel konzipiert, welche nach Verwendung weggeworfen werden.

Die Erfindung wird im folgenden anhand von Zeichnungen näher erläutert. Es zeigen:

Figur 1 eine erfindungsgemäße Vorrichtung in schematischer Darstellung,

Figuren 2a, 2b, 3 und 4 Ausführungsvarianten der Vorrichtung nach Fig. 1,

Figur 5 eine automatisch messende Ausführungsvariante zur gleichzeitigen Messung mehrerer Behälter,

Figur 6 und 7 Ausführungsvarianten nach Fig. 5 im Detail, sowie

Figur 8 bis 10 Diagramme von Meßkurven.

Die in Fig. 1 dargestellte Vorrichtung zur Feststellung biologischer Aktivitäten in einer Probe, weist einen verschließbaren, optisch durchlässigen Behälter 1 auf, an dessen Innenwand 2 eine Optode 3, beispielsweise mit einer optisch durchlässigen Kleberschicht 4, befestigt ist.

Anstelle einer einzelnen Optode 3 für eine zu messende Substanz können auch zwei oder mehrere Optoden 3a, 3b und 3c zu einem Multilayer-Sensor zusammengefaßt sein, sodaß gleichzeitig, beispielsweise die Konzentrationsänderungen von O_2 und CO_2 sowie die Änderung des pH-Wertes festgestellt werden können. Die einzelnen Optoden 3a, bis 3c bzw. deren Indikatorsubstanzen können auch schichtweise übereinander angeordnet oder in einer Polymermembran homogen verteilt eingebettet sein. Die Kombination einer CO_2 - und einer O_2 -Optode zu seinem Sensor ist beispielsweise aus der EP-A 105 870 bekannt geworden.

Anstelle der in den folgenden Ausführungsvarianten mit 3 bezeichneten Optode können Optoden zur Messung von O_2 , CO_2 , H^+ (pH), NH_4^+ , H_2S und H_2 , bzw. eine für die jeweilige Meßsituation erforderliche Kombination dieser Optoden angeordnet sein.

Im Behälter 1 befindet sich die Nährlösung 5 mit z.B. einer Kohlenstoffverbindung (Glucose), welche durch metabolische Prozesse von in der Probe vorliegenden Mikroorganismen in ein Stoffwechselprodukt, beispielsweise in CO_2 umgewandelt wird, wobei gleichzeitig z.B. O_2 verbraucht wird und sich der pH-Wert ändert. Dadurch ändert sich im Gasraum 6 über der Nährlösung 5, sowie in der Nährlösung selbst die Konzentration des Stoffwechselproduktes und der Ausgangsstoffe, welche mit den Optoden 3a, 3b, 3c, welche in Fig. 1 am Boden 7 des Behälters 1 angeordnet sind, gemessen wird. Die Anregungs- und Detektionseinrichtung 8 besteht aus einer Lichtquelle 9, einem Detektor 11 sowie einem zweiarmigen Lichtleiter 10, dessen einer Arm mit der Lichtquelle und dessen anderer Arm mit dem Detektor 11 in Verbindung steht. Das Ende 12 des Lichtleiters liegt direkt an der Außenwand 13 des Behälters an und versorgt

die Optoden 3a, 3b, 3c durch die optisch durchlässige Behälterwand mit Anregungsstrahlung und empfängt gleichzeitig das optische Signal, beispielsweise die von den Optoden emittierte Fluoreszenzstrahlung.

Durch entsprechende Filtereinrichtungen 31, beispielsweise ein Filterrad, vor dem Detektor 11 kann dafür gesorgt werden, daß die entsprechenden Signale den jeweiligen Optoden 3a, 3b, 3c zugeordnet werden können.

Die Detektorsignale werden über eine Leitung 14 einer Auswerteeinrichtung 15 zugeführt, in welcher die zeitliche Änderung beispielsweise des CO_2 -Gehaltes festgestellt und der Status der Probe über ein Display 16 angezeigt wird.

Die für den Ablauf der metabolischen Prozesse notwendigen Bedingungen im Behälter werden mit Hilfe der Einrichtung 17 aufrecht erhalten, wobei die Einrichtung 17 vor allem für die richtige Thermostatisierung der Probe verantwortlich ist und über eine Steuerleitung 18 mit der Auswerteeinrichtung 15 verbunden ist.

Anstelle der Einrichtung 17 kann in Fig. 1 und allen folgenden Ausführungsvarianten auch eine Luftheizung zur Thermostatisierung der Proben verwendet werden.

Die in Fig. 2a dargestellte Ausführungsvariante unterscheidet sich von jener nach Fig. 1 nur dadurch, daß die Optode 3 im Gasraum 6 des Behälters 1 angeordnet ist und nur gasförmige Metaboliten gemessen werden können. Die Thermostatisierung erfolgt hier über den Boden 7 des Behälters 1. Entsprechend einer Ausführungsvariante nach Fig. 2b kann die Optode 3, bzw. Optoden 3a, 3b, an einem den Behälter 1 verschließenden Stöpsel 1' angeordnet sein. Der Lichtleiter 10 kann dabei durch den Stöpsel durchgeführt, bzw., wie aus Fig. 2b ersichtlich, von außen an einen optisch durchlässigen Stöpsel 1' herangeführt sein.

Bei einer weiteren, in Fig. 3 dargestellten Ausführungsvariante ist die Optode 3 an der Spitze einer Sonde 19 befestigt, welche das Ende des zweiarmigen Lichtleiters 10 aufnimmt. Die Sonde 19 wird durch die mit einem Septum 20 verschlossene Öffnung 21 des Behälters 1 in diesen eingeführt und

kann entlang des Pfeiles 22 axial verschoben werden, sodaß Messungen sowohl im Gasraum 6 als auch in der Nährlösung 5 möglich sind.

Bei der in Fig. 4 dargestellten Ausführungsvariante ist die Optode 3, beispielsweise zur Messung von O_2 und CO_2 nicht im Behälter 1 sondern in einem Probennahmegefäß 23 angeordnet. Zur Einbringung der Probe in den Kulturbedälter wird das Septum 20 des Behälters 1 von der Hohnadel 24 des Probennahmegefäßes 23 durchstoßen, wodurch die Probe in die Nährlösung gelangt. Über die Hohnadel 24 kommt es dann zu einem Gasaustausch zwischen Gasraum 6 und Innenraum 25 des Probennahmegefäßes 23, wodurch die Änderung der Konzentration von CO_2 und O_2 mittels der hier nicht weiter dargestellten Anregungs- und Detektionseinrichtung 8 erfaßbar ist.

Eine besonders vorteilhafte Ausführungsvariante ist in Fig. 5 dargestellt, wo auf einer als thermostatisierbare Trägerplatte ausgeführte Einrichtung 26 mehrere Behälter 1 gleichzeitig in markierten Positionen aufgenommen werden können. Die Behälter 1 sind in mehreren Reihen angeordnet, sodaß gleichzeitig bis zu 600 Behälter thermostatisiert und kontinuierlich vermessen werden können. Jedem Behälter ist ein in der Trägerplatte 26 angeordneter zweiarmiger Lichtleiter 10 zugeordnet, der die am Boden jedes Behälters 1 angeordneten Optoden 3a bis 3c mit Anregungsstrahlung versorgt. Die entsprechenden optischen Signale werden den einzelnen Detektoren 11 zugeführt, welche mit der Auswerteeinrichtung 15 über Leitungen 14 verbunden sind. Zu den einzelnen Meßwerten wird der Auswerteeinheit 15 gleichzeitig ein Positionserkennungssignal zugeführt, wodurch die einzelnen Meßwerte direkt der entsprechenden Probe zuordenbar sind.

Eine Ausführungsvariante nach Fig. 6 sieht vor, daß jedem der einzelnen Behälter (1) eine direkt in der Trägerplatte 26 angeordnete LED 27 sowie eine Photodiode 28 zugeordnet ist, wobei auch Filterelemente vorgeschaltet sein können. Die Vorrichtung wird dadurch äußerst kompakt und enthält überhaupt keine beweglichen Teile oder Lichtleiteranlagen. Die elektrischen Anschlüsse der LED 27 bzw. der Photodiode 28 sind mit 30 und 29 bezeichnet.

In Fig. 7 ist eine Ausführungsvariante nach Fig. 6 dargestellt, welche zwei zu einem Sensor zusammengefaßte Optoden 3a und 3b aufweist (z.B. ein Bisensor zur gleichzeitigen Messung der O_2 -Konzentration und des pH-Wertes). Die Optoden werden über unterschiedliche LEDs 27 und 27' angeregt und deren Emissionsstrahlung von einer gemeinsamen Photodiode 28 erfaßt. Die entsprechenden elektrischen Anschlüsse 29, 29' und 30 führen zur hier nicht dargestellten Auswerteeinheit. Durch bekannte optische bzw. elektronische Einrichtungen können die Signale der beiden Optoden getrennt werden. Andere Ausführungen mit nur einer LED zur Anregung und mehreren Photodioden zur Signalerfassung liegen im Rahmen der Erfindung.

In den in den Fig. 8 bis 9 dargestellten Diagrammen von Meßbeispielen sind auf der Abszisse jeweils die Zeit t bzw. einzelne Zeitpunkte T_0 bis T_6 aufgetragen und auf der Ordinate der pH-Wert, die Konzentration K (bzw. der Partialdruck von O_2 und CO_2), sowie die Anzahl n der Bakterien bzw. Organismen pro Volumseinheit (logarithmische Skala).

Fig. 8 zeigt die zeitliche Veränderung der Parameter O_2 , CO_2 und pH-Wert anhand einer Probe mit *Staphylokokkus aureus*. Zwischen T_0 und T_6 steigt die CO_2 -Konzentration signifikant an und zeigt damit eine positive Probe an, wonach zum Zeitpunkt T_m die O_2 -Konzentration und der pH-Wert gemessen werden. Die stark fallende O_2 -Konzentration und der stark fallende pH-Wert deuten auf grampositive *Staphylokokkus aureus* hin.

Zum Unterschied dazu bleibt in Fig. 9 der pH-Wert im wesentlichen unverändert, was entsprechend obenstehender Tabelle das Vorhandensein von *Pseudomonas* Spezies andeutet. Verwendet wurde hier eine Probe mit *Pseudomonas aeruginosa*.

Die in Fig. 10 angeführten Meßwerte stammen von einer Probe, die Enterobakterien (*E.coli*) enthält.

Das vorliegende Verfahren bzw. die beschriebene Vorrichtung eignet sich hervorragend zur Feststellung biologischer Aktivität in Proben, beispielsweise von Keimen in Blut, Bakterämien, Sepsis oder Pyämien aber auch von Algen, Bakterien oder anderen Keimen.

Durch das kontinuierliche, nichtinvasive Monitoring kann eine vollständige Automatisierung des Brut- und Meßvorganges für eine große Anzahl von Proben erreicht werden. Positive Kulturen werden rasch erkannt, wodurch falsche Negativbefunde weitgehend vermieden werden können.

Patentansprüche:

P A T E N T A N S P R Ü C H E

1. Verfahren zur Feststellung biologischer Aktivitäten in einer Probe, wobei die Probe und eine Nährlösung in einen verschließbaren Behälter gefüllt und Bedingungen ausgesetzt werden, welche bei Vorliegen von Mikroorganismen in der Probe metabolische Prozesse ermöglichen, wobei die Konzentration von Ausgangsstoffen vermindert und jene von Stoffwechselprodukten erhöht wird, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration zumindest eines durch metabolische Prozesse umsetzbaren (gewonnenen oder verbrauchten) Stoffes kontinuierlich gemessen wird und bei Änderung der Konzentration um einen vorgebbaren Schwellwert die Konzentrationsänderung zumindest eines weiteren Stoffes gemessen wird, wobei mittels Optoden, welche in direktem Kontakt mit den zu messenden Stoffen stehen, ein Meßsignal erzeugt wird, aus dessen zeitlicher Änderung auf das Vorliegen von Mikroorganismen geschlossen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration zumindest zweier Stoffe aus der Gruppe CO_2 , O_2 , $\text{H}^+(\text{pH})$, NH_4^+ , H_2S und H_2 gemessen wird, wobei die Indikatorsubstanz der Optoden auf eine Änderung der Konzentration der Stoffe mit einer Änderung ihres Lumineszenz-, Absorptions- oder Reflexionsverhaltens reagiert.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration zumindest zweier Stoffe aus der Gruppe CO_2 , O_2 , $\text{H}^+(\text{pH})$ und NH_4^+ gemessen wird, wobei die Indikatorsubstanz der Optoden auf eine Änderung der Konzentration der Stoffe mit einer Änderung der Lumineszenzabklingzeit der emittierten Lumineszenzstrahlung reagiert.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die CO_2 -Konzentration kontinuierlich gemessen und daß nach deren Anstieg um 0,1 bis 10% über einen minimalen Wert die Änderung der O_2 -Konzentration und die Änderung des pH-Wertes bestimmt wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die O_2 -Konzentration kontinuierlich gemessen und daß nach deren Abfall um 0,1 bis 10 % von einem maximalen Wert die Änderung der CO_2 -Konzentration und die Änderung des pH-Wertes bestimmt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß bei schwach fallender O_2 -Konzentration und einem schwachen Absinken des pH-Wertes auf das Vorliegen von Enterobakterien oder auf Staphylokokkus epidermidis geschlossen wird.
7. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß bei stark fallender O_2 -Konzentration und stabilem pH-Wert auf das Vorliegen von Pseudomonas Spezies geschlossen wird.
8. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß bei stark fallender O_2 -Konzentration und schwach fallendem pH-Wert auf das Vorliegen von Acinetobacter Spezies geschlossen wird.
9. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß bei unveränderter O_2 -Konzentration und schwach fallendem pH-Wert auf bakterioide Spezies geschlossen wird.
10. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß bei stark fallender O_2 -Konzentration und stark fallendem pH-Wert auf Staphylokokkus aureus oder auf Streptokokkus faecalis geschlossen wird.
11. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß bei schwach fallender O_2 -Konzentration und stark fallendem pH-Wert auf das Vorliegen von Streptokokkus pyogenes, Streptokokkus pneumoniae oder Candida albicans geschlossen wird.
12. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß bei gleichbleibender O_2 -Konzentration und stark fallendem pH-Wert auf das Vorliegen von Clostridium perfringens geschlossen wird.
13. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich die Gramfärbung der Probe festgestellt wird und

bei negativer Gramfärbung auf das Vorliegen von Enterobakterien, bei positiver Gramfärbung auf das Vorliegen von Staphylokokkus epidermidis geschlossen wird.

14. Verfahren zur Feststellung biologischer Aktivitäten in einer Probe, wobei die Probe und eine Nährlösung in einen verschließbaren Behälter gefüllt und Bedingungen ausgesetzt werden, welche bei Vorliegen von Mikroorganismen in der Probe metabolische Prozesse ermöglichen, wobei die CO_2 -Konzentration erhöht wird, dadurch gekennzeichnet, daß die CO_2 -Konzentration mittels eines im Behälter angeordneten, von außen mit Anregungsstrahlung versorgten CO_2 -sensitiven Fluoreszenz-Sensor gemessen wird, sowie daß aus der zeitlichen Änderung des vom Fluoreszenz-Sensor emittierten Signals auf das Vorliegen von Mikroorganismen geschlossen wird.
15. Verfahren zur Feststellung biologischer Aktivitäten in einer Blutprobe, dadurch gekennzeichnet, daß in einen verschließbaren Behälter eine eine Kohlenstoff-Verbindung enthaltende Nährlösung gefüllt wird, daß der Nährlösung ein auf die Änderung des CO_2 -Gehaltes mit einer Änderung des Fluoreszenzverhaltens reagierender Fluoreszenzindikator zugesetzt wird, daß in den Behälter eine Blutprobe eingebracht wird, wobei bei Vorliegen von Mikroorganismen in der Probe metabolische Prozesse ermöglicht werden, bei welchen CO_2 produziert wird, daß der Inhalt des Behälters mit Anregungsstrahlung beaufschlagt und die vom Fluoreszenzindikator emittierte Strahlung gemessen wird, wobei aus einer Änderung des Fluoreszenzverhaltens auf das Vorliegen von Mikroorganismen geschlossen wird.
16. Vorrichtung zur Feststellung biologischer Aktivitäten in einer Probe, wobei ein verschließbarer Behälter vorgesehen ist, welcher eine Nährlösung enthält und zur Aufnahme der Probe dient, wobei Einrichtungen vorgesehen sind, die bei Vorliegen von Mikroorganismen in der Probe metabolische Prozesse ermöglichen, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Optoden (3a, 3b, 3c) zur gleichzeitigen Bestimmung mehrerer durch den metabolischen Prozeß in deren Konzentration veränderbarer Stoffe vorgesehen sind, sowie daß eine jeder Optode (3a, 3b, 3c) zugeordnete Anregungs- und Detektions-

einrichtung (8) vorgesehen ist, mit welcher eine Auswerteeinrichtung (15) zur Feststellung der zeitlichen Änderung der Konzentration der Stoffe verbunden ist.

17. Vorrichtung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß Optoden (3a, 3b) zur selektiven Erfassung zumindest zweier im metabolischen Prozeß als Ausgangs-, Zwischen- oder Endprodukt vorliegender Stoffe aus der Gruppe CO_2 , O_2 , H_2 , $\text{H}^+(\text{pH})$, NH_4^+ und H_2S vorhanden sind.
18. Vorrichtung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß Optoden zur gleichzeitigen Bestimmung von CO_2 , O_2 und $\text{H}^+(\text{pH})$ vorhanden sind.
19. Vorrichtung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß Optoden zur gleichzeitigen Bestimmung von CO_2 , NH_4^+ und $\text{H}^+(\text{pH})$ vorhanden sind.
20. Vorrichtung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß Optoden zur gleichzeitigen Bestimmung von CO_2 , H_2S und $\text{H}^+(\text{pH})$ vorhanden sind.
21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 17 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Optoden zu einem Multilayer-Sensor zusammengefaßt sind.
22. Vorrichtung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Optoden (3a, 3b) im Gasraum (6) des zumindest teilweise optisch durchlässigen Behälters (1) über der mit der Probe versetzten Nährlösung angeordnet sind und die Änderung der Konzentration zumindest eines gasförmigen Metaboliten messen.
23. Vorrichtung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Optoden (3a, 3b) an einem den Behälter (1) verschließenden, optisch durchlässigen Stöpsel (1') angeordnet sind.
24. Vorrichtung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß eine Einrichtung (26) zur Thermostatisierung der Probe vorgesehen ist, in welcher in markierten Positionen mehrere Behälter (1) gleichzeitig angeordnet sind, wobei jedem der Behälter (1) eine Anregungs- und Detektionseinrichtung (8) zugeordnet ist, welche die in jedem Be-

hälter (1) angeordneten Optoden (3a, 3b, 3c) mit Anregungsstrahlung versorgt und das resultierende optische Signal detektiert, sowie daß die Signale der Detektionseinrichtung samt einem Positionserkennungssignal der Auswerteeinrichtung (15) zuführbar sind.

25. Vorrichtung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß eine Einrichtung (26) zur Thermostatisierung der Probe vorgesehen ist, welche mehrere Behälter (1) gleichzeitig aufnimmt, sowie daß ein Zuführmechanismus oder Probenwechsler vorgesehen ist, welcher die einzelnen Behälter (1) automatisch einem Meßplatz zuführt, in welchem die in jedem Behälter (1) angeordneten Optoden (3a, 3b, 3c) mit der Anregungs- und Detektionseinrichtung (8) in optischen Kontakt treten.
26. Vorrichtung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Optoden an der Spitze einer in den Behälter (1) einführbaren Sonde (19) befestigbar sind, welche Sonde (19) Lichtleiteinrichtungen (10) der Anregungs- und Detektionseinrichtung (8) aufnimmt.
27. Vorrichtung nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde (19) durch eine mit einem Septum (20) verschlossene Öffnung (21) des Behälters (1) in die mit der Probe versetzte Nährlösung oder in den Gasraum (6) darüber einbringbar ist.
28. Vorrichtung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß der Behälter (1) mit einem Septum (20) verschlossen ist, welches von der Hohnadel (24) eines Probennahmegefäßes (23) durchstechbar ist, wobei die Optoden (3a, 3b, 3c) im Probennahmegefäß (23) angeordnet sind und nach dem Einbringen der Probe in den die Nährlösung enthaltenden Behälter (1) über die Hohnadel (24) des Probennahmegefäßes (23) eine Strömungsverbindung vom Gasraum (6) des Behälters (1) zu den Optoden (3a, 3b, 3c) besteht.

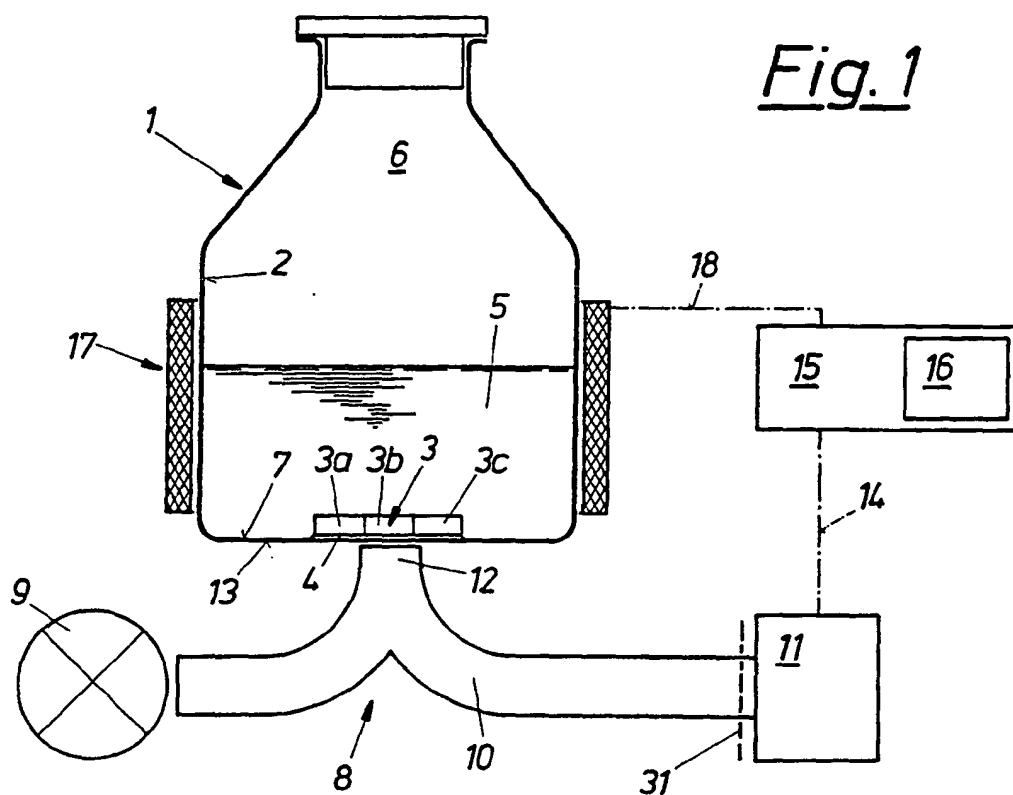
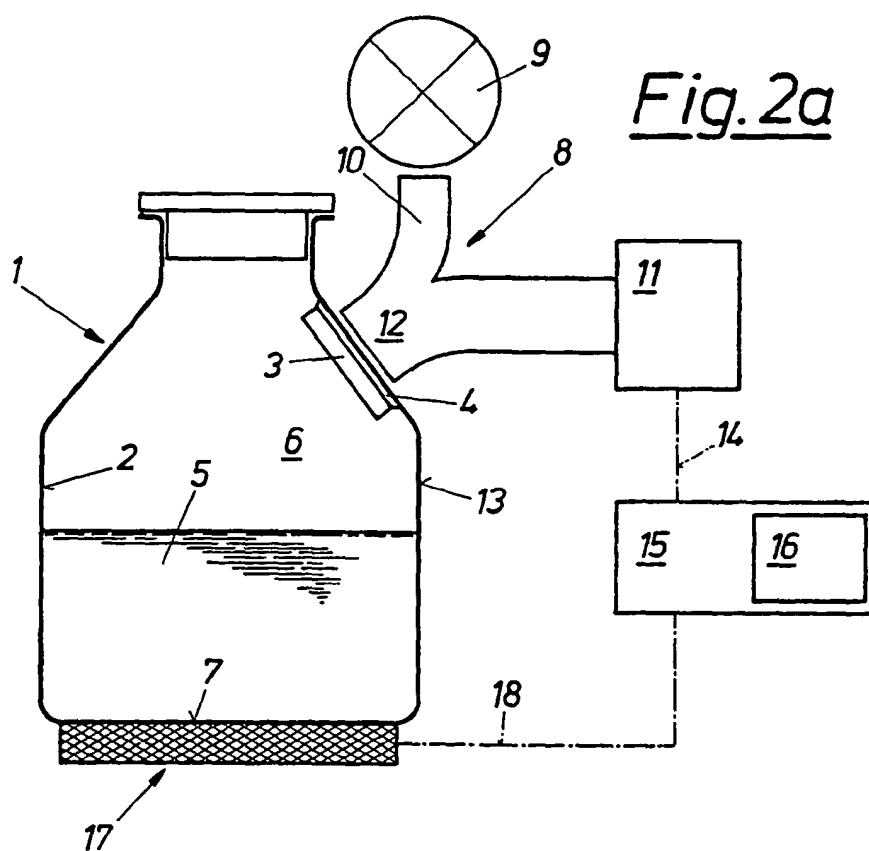
Fig. 1Fig. 2a

Fig. 3

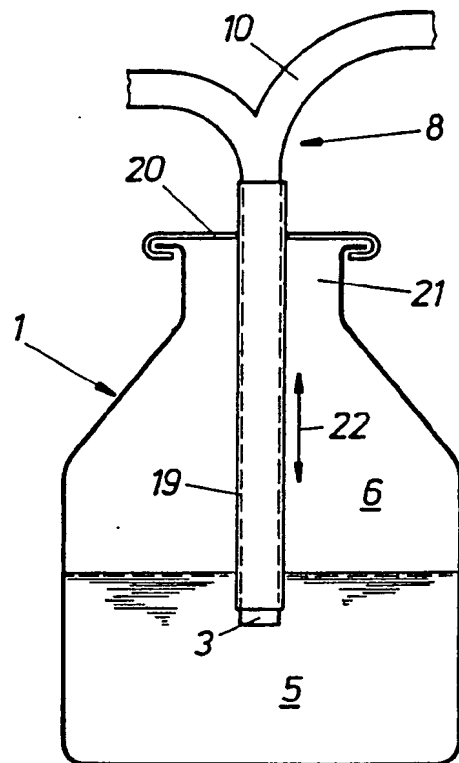
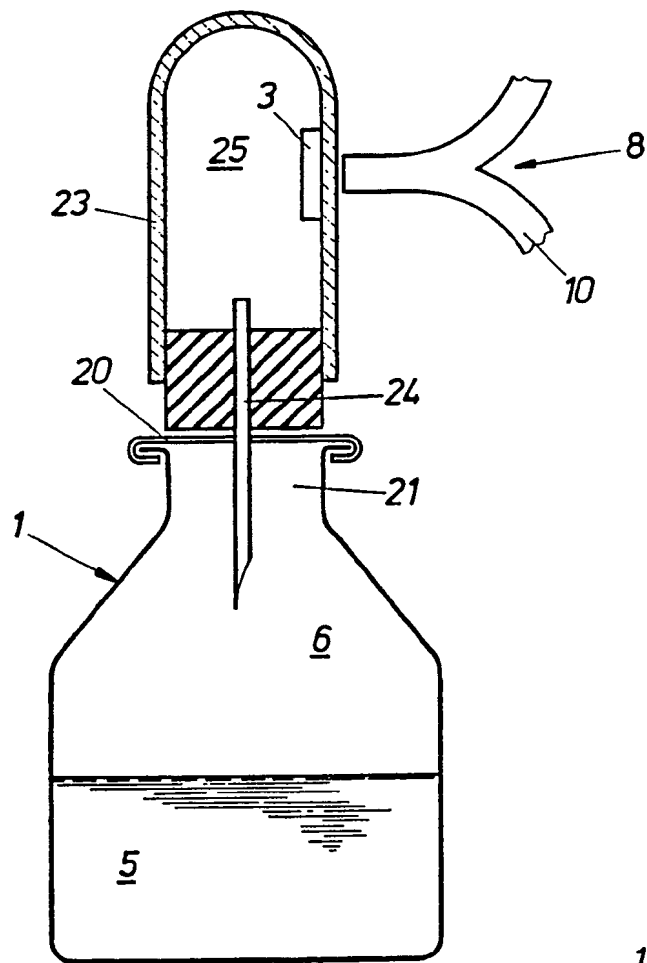


Fig. 4

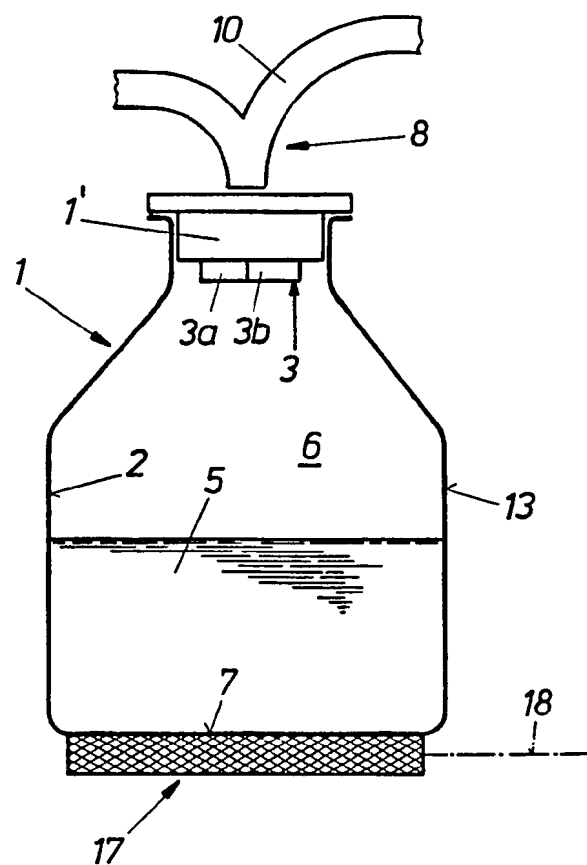


Fig. 2b

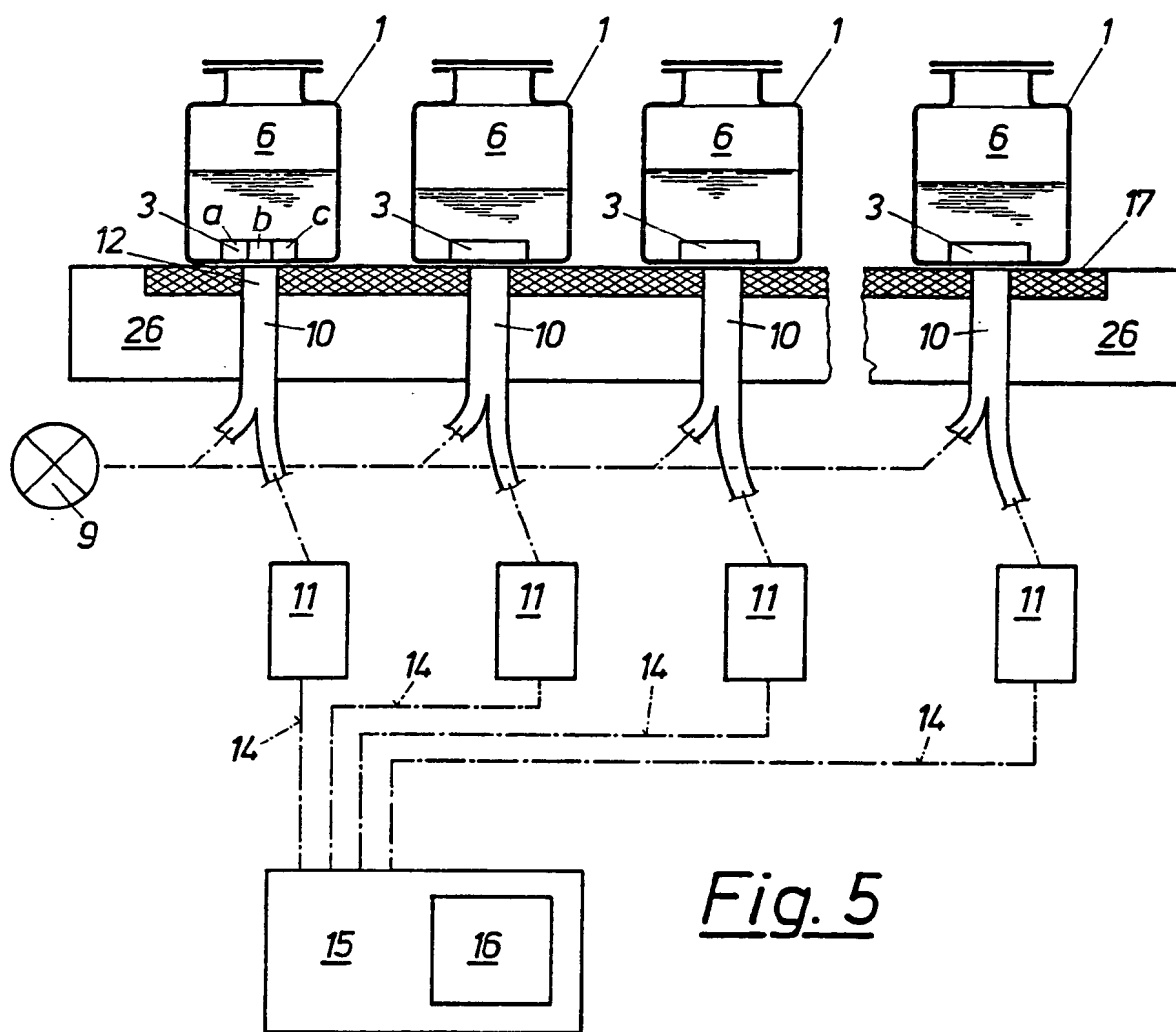


Fig. 5

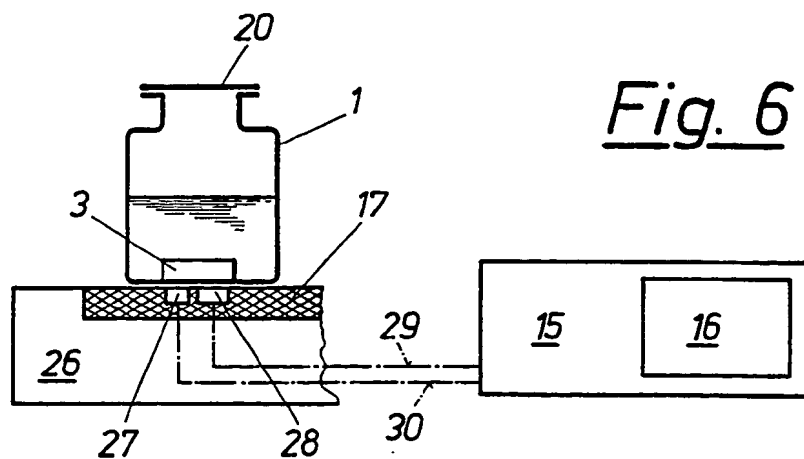
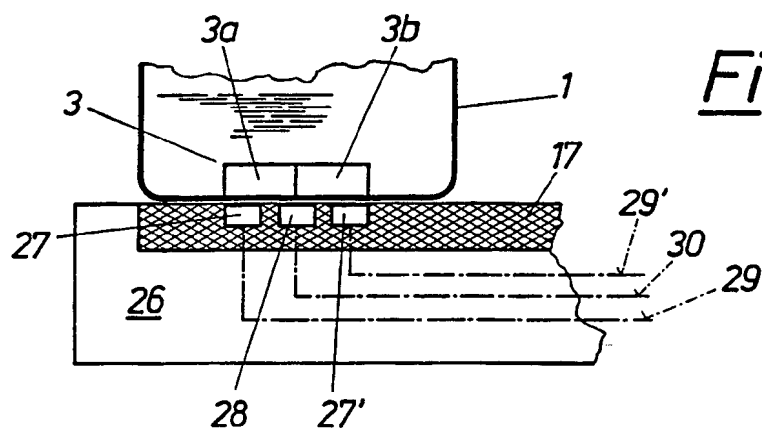
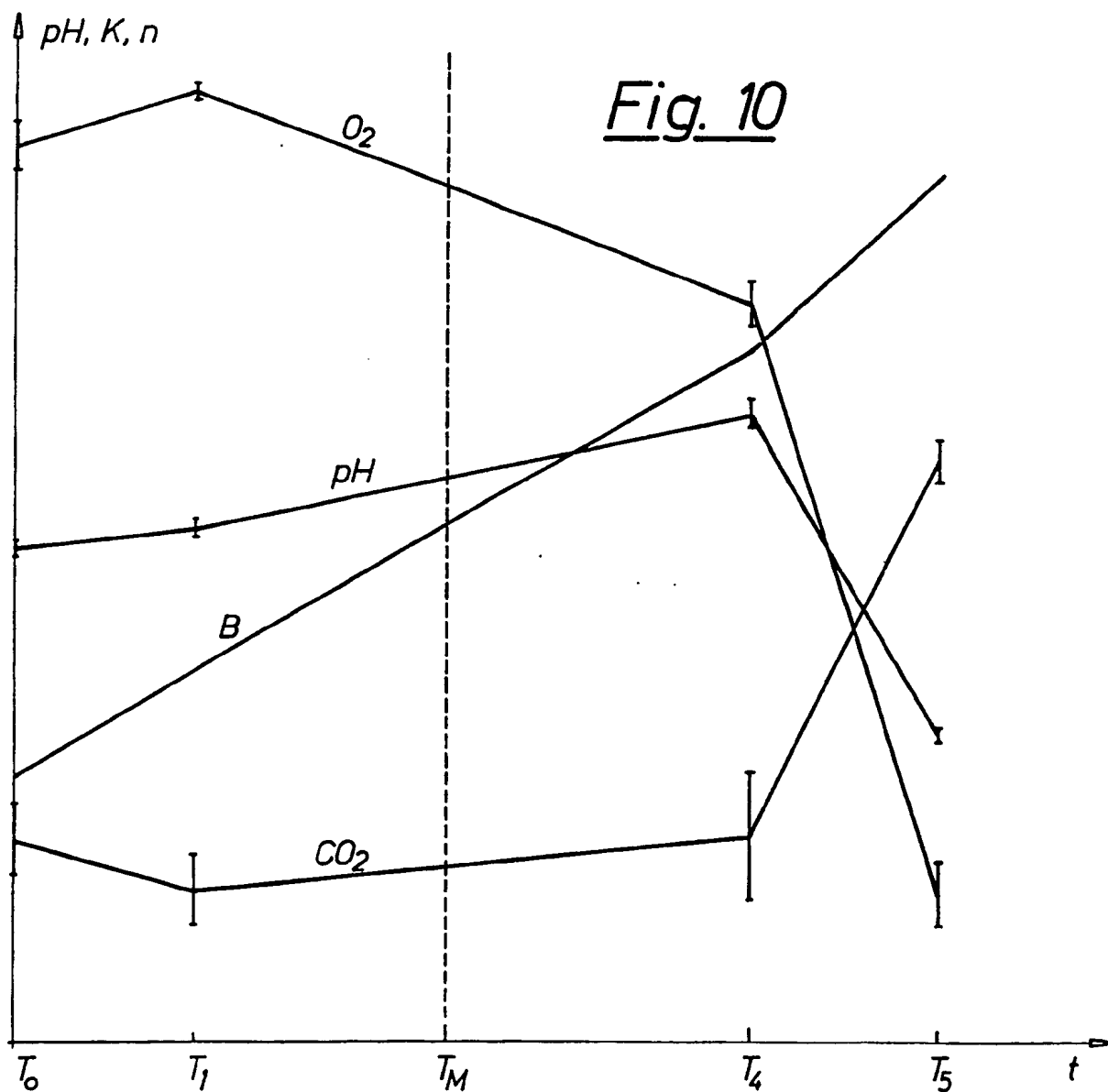
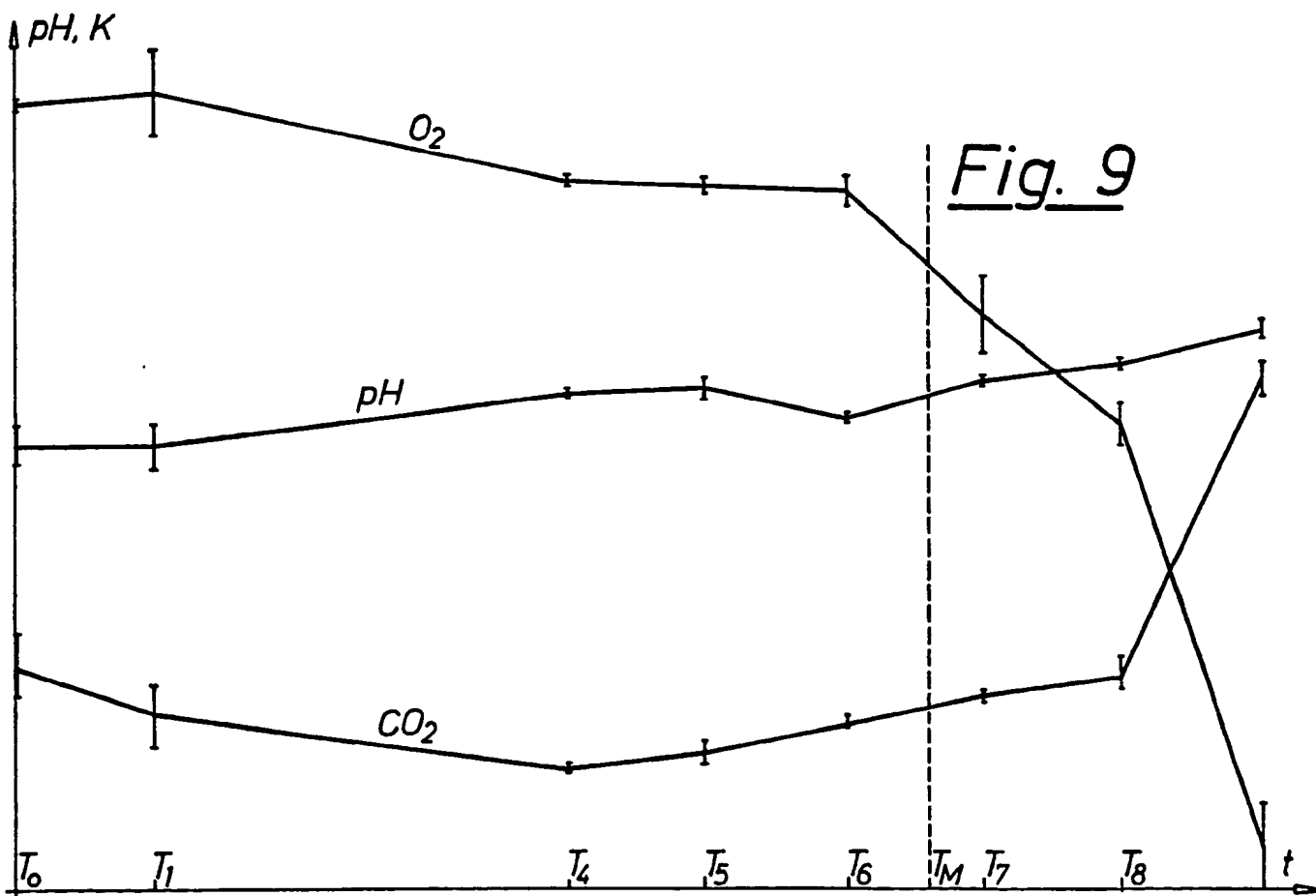
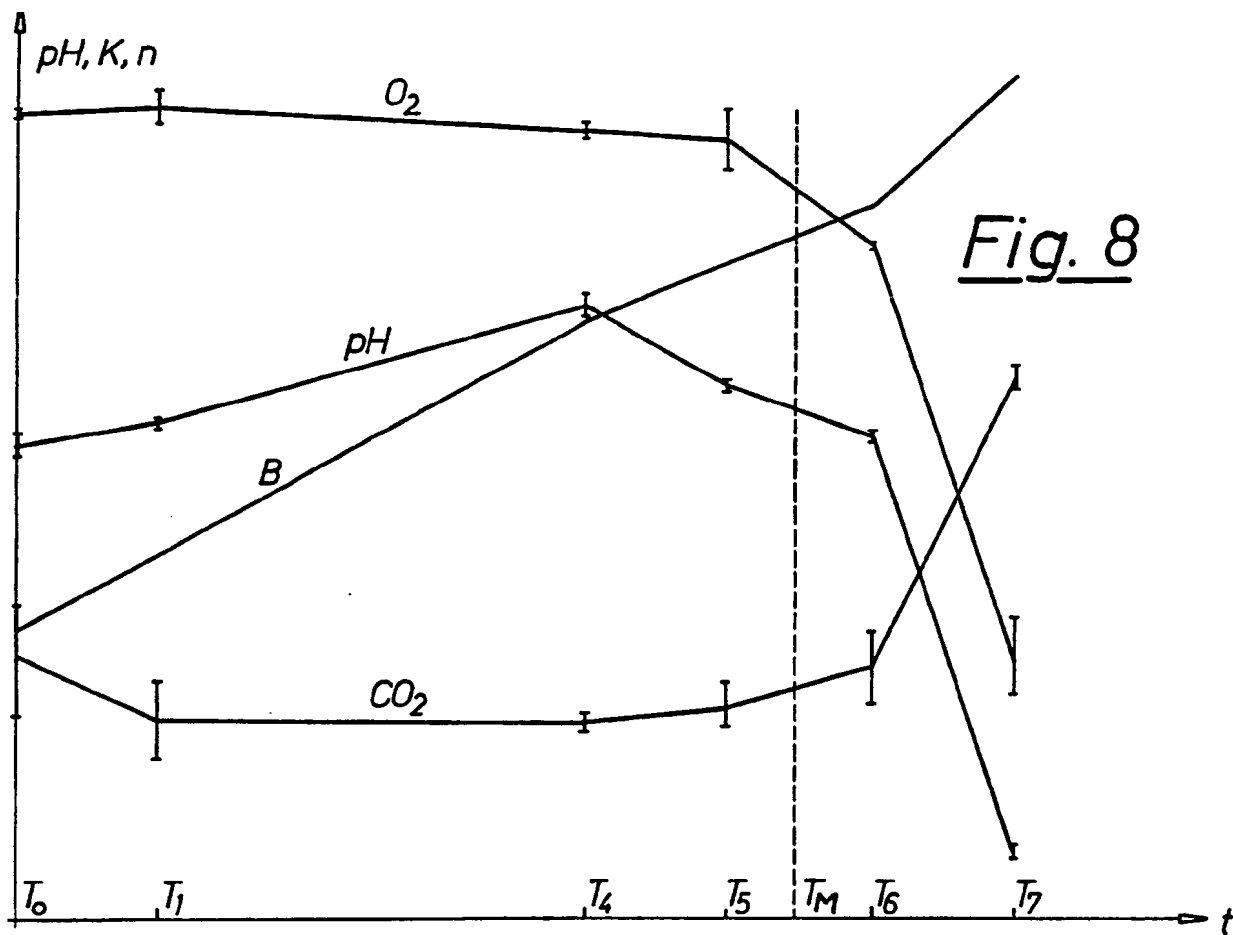


Fig. 6

Fig. 7Fig. 10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/AT89/00110

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl ⁵ : C12Q 1/04, C12M 1/34																	
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Minimum Documentation Searched ⁷</div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 25%; padding: 5px;">Classification System</th> <th style="padding: 5px;">Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="padding: 10px; vertical-align: top;">Int.Cl⁵</td> <td style="padding: 10px; vertical-align: top;">C12Q, C12M</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸</div>			Classification System	Classification Symbols	Int.Cl ⁵	C12Q, C12M											
Classification System	Classification Symbols																
Int.Cl ⁵	C12Q, C12M																
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Category [*]</th> <th style="width: 70%; padding: 5px;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 20%; padding: 5px;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> <tr> <td style="padding: 10px; vertical-align: top;">P, X</td> <td style="padding: 10px; vertical-align: top;">EP, A, 0333253 (AKZO N.V.) 20 September 1989 see the whole document -----</td> <td style="padding: 10px; vertical-align: top;">1-28</td> </tr> <tr> <td style="padding: 10px; vertical-align: top;">Y</td> <td style="padding: 10px; vertical-align: top;">Patent Abstracts of Japan, Volume 7, No. 64 (P-183) (1209), 17 March 1983, & JP, A, 57207861 (OLYMPUS KOGAKU KOGYO K.K.) 20 December 1982, see abstract -----</td> <td style="padding: 10px; vertical-align: top;">1-28</td> </tr> <tr> <td style="padding: 10px; vertical-align: top;">Y</td> <td style="padding: 10px; vertical-align: top;">EP, A, 0105870 (AVL AG) 18 April 1984 see the whole document (cited in the application) -----</td> <td style="padding: 10px; vertical-align: top;">1-28</td> </tr> <tr> <td style="padding: 10px; vertical-align: top;">Y</td> <td style="padding: 10px; vertical-align: top;">WO, A, 82/04264 (B. MATTIASSON) 9 December 1982 see page 2, line 34 - page 3, line 25 -----</td> <td></td> </tr> </table>			Category [*]	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	P, X	EP, A, 0333253 (AKZO N.V.) 20 September 1989 see the whole document -----	1-28	Y	Patent Abstracts of Japan, Volume 7, No. 64 (P-183) (1209), 17 March 1983, & JP, A, 57207861 (OLYMPUS KOGAKU KOGYO K.K.) 20 December 1982, see abstract -----	1-28	Y	EP, A, 0105870 (AVL AG) 18 April 1984 see the whole document (cited in the application) -----	1-28	Y	WO, A, 82/04264 (B. MATTIASSON) 9 December 1982 see page 2, line 34 - page 3, line 25 -----	
Category [*]	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³															
P, X	EP, A, 0333253 (AKZO N.V.) 20 September 1989 see the whole document -----	1-28															
Y	Patent Abstracts of Japan, Volume 7, No. 64 (P-183) (1209), 17 March 1983, & JP, A, 57207861 (OLYMPUS KOGAKU KOGYO K.K.) 20 December 1982, see abstract -----	1-28															
Y	EP, A, 0105870 (AVL AG) 18 April 1984 see the whole document (cited in the application) -----	1-28															
Y	WO, A, 82/04264 (B. MATTIASSON) 9 December 1982 see page 2, line 34 - page 3, line 25 -----																
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>[*] Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>																	
IV. CERTIFICATION <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of the Actual Completion of the International Search 21 February 1990 (21.02.90) </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of Mailing of this International Search Report 15 March 1990 (15.03.90) </td> </tr> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> International Searching Authority European Patent Office </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Signature of Authorized Officer </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search 21 February 1990 (21.02.90)	Date of Mailing of this International Search Report 15 March 1990 (15.03.90)	International Searching Authority European Patent Office	Signature of Authorized Officer											
Date of the Actual Completion of the International Search 21 February 1990 (21.02.90)	Date of Mailing of this International Search Report 15 March 1990 (15.03.90)																
International Searching Authority European Patent Office	Signature of Authorized Officer																

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

AT 8900110

SA 32612

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 09/03/90
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0333253	20-09-89	AU-A- 3128889	21-09-89
EP-A- 0105870	18-04-84	AT-A,B 386078	27-06-88
		AT-A- 379687	10-02-86
		JP-A- 59087343	19-05-84
WO-A- 8204264	09-12-82	SE-B- 430900	19-12-83
		EP-A,B 0093116	09-11-83
		SE-A- 8103520	05-12-82
		US-A- 4592994	03-06-86

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/AT 89/00110

I. KLASSEFIZKATION DES ANMELDUNGS-GE-GENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben; ⁶ Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.Cl. ⁵ C 12 Q 1/04, C 12 M 1/34														
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE <div style="text-align: center; margin-top: 5px;">Recherchierter Mindestprüfstoff⁷</div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; padding: 5px;">Klassifikationssystem</td> <td style="padding: 5px;">Klassifikationssymbole</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Int.Cl.⁵</td> <td style="padding: 5px;">C 12 Q, C 12 M</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; margin-top: 5px;">Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen⁸</div>			Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	Int.Cl. ⁵	C 12 Q, C 12 M								
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole													
Int.Cl. ⁵	C 12 Q, C 12 M													
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Art*</th> <th style="width: 70%; padding: 5px;">Kennzeichnung der Veröffentlichung¹¹, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile¹²</th> <th style="width: 20%; padding: 5px;">Betr. Anspruch Nr. 13</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">P,X</td> <td style="padding: 5px;"> EP, A, 0333253 (AKZO N.V.) 20. September 1989 siehe das ganze Dokument <div style="text-align: center;">--</div> </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-28</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;"> Patent Abstracts of Japan, Band 7, Nr. 64 (P-183) (1209), 17. März 1983, & JP, A, 57207861 (OLYMPUS KOGAKU KOGYO K.K.) 20. Dezember 1982, siehe die Zusammenfassung <div style="text-align: center;">--</div> </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-28</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;"> EP, A, 0105870 (AVL AG) 18. April 1984 siehe das ganze Dokument (in der Anmeldung erwähnt) <div style="text-align: center;">--</div> </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-28</td> </tr> </table>			Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. 13	P,X	EP, A, 0333253 (AKZO N.V.) 20. September 1989 siehe das ganze Dokument <div style="text-align: center;">--</div>	1-28	Y	Patent Abstracts of Japan, Band 7, Nr. 64 (P-183) (1209), 17. März 1983, & JP, A, 57207861 (OLYMPUS KOGAKU KOGYO K.K.) 20. Dezember 1982, siehe die Zusammenfassung <div style="text-align: center;">--</div>	1-28	Y	EP, A, 0105870 (AVL AG) 18. April 1984 siehe das ganze Dokument (in der Anmeldung erwähnt) <div style="text-align: center;">--</div>	1-28
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. 13												
P,X	EP, A, 0333253 (AKZO N.V.) 20. September 1989 siehe das ganze Dokument <div style="text-align: center;">--</div>	1-28												
Y	Patent Abstracts of Japan, Band 7, Nr. 64 (P-183) (1209), 17. März 1983, & JP, A, 57207861 (OLYMPUS KOGAKU KOGYO K.K.) 20. Dezember 1982, siehe die Zusammenfassung <div style="text-align: center;">--</div>	1-28												
Y	EP, A, 0105870 (AVL AG) 18. April 1984 siehe das ganze Dokument (in der Anmeldung erwähnt) <div style="text-align: center;">--</div>	1-28												
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>														
IV. BESCHEINIGUNG <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Datum des Abschlusses der internationalen Recherche <div style="text-align: center;">21. Februar 1990</div> </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: center;">15 MAR 1990</div> </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"> Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center;">Europäisches Patentamt</div> </td> <td style="padding: 5px;"> Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten <div style="text-align: center;"> T.K. WILLIS </div> </td> </tr> </table>			Datum des Abschlusses der internationalen Recherche <div style="text-align: center;">21. Februar 1990</div>	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: center;">15 MAR 1990</div>	Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center;">Europäisches Patentamt</div>	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten <div style="text-align: center;"> T.K. WILLIS </div>								
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche <div style="text-align: center;">21. Februar 1990</div>	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: center;">15 MAR 1990</div>													
Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center;">Europäisches Patentamt</div>	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten <div style="text-align: center;"> T.K. WILLIS </div>													

III.EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p data-bbox="256 210 1088 336">WO, A; 82/04264 (B. MATTIASSON) 9. Dezember 1982 siehe Seite 2, Zeile 34 - Seite 3, Zeile 25</p> <p data-bbox="641 409 844 420">-----</p>	

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

AT 8900110

SA 32612

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 09/03/90

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0333253	20-09-89	AU-A- 3128889	21-09-89
EP-A- 0105870	18-04-84	AT-A, B 386078	27-06-88
		AT-A- 379687	10-02-86
		JP-A- 59087343	19-05-84
WO-A- 8204264	09-12-82	SE-B- 430900	19-12-83
		EP-A, B 0093116	09-11-83
		SE-A- 8103520	05-12-82
		US-A- 4592994	03-06-86

